

PROPHYLAXIE DE LA POLIOMYÉLITE*

Présent et avenir

PIERRE LÉPINE

Chef du Service des Virus, Institut Pasteur, Paris

RÉSUMÉ

Après avoir mentionné les diverses méthodes de prophylaxie de la poliomyélite, les principes sur lesquels elles sont fondées et leurs applications éventuelles, l'auteur discute en détail la question de la vaccination par des vaccins de divers types, les difficultés à surmonter et les perspectives qu'offre ce procédé d'immunisation.

MÉTHODES PROPHYLACTIQUES

En dehors des mesures générales d'hygiène et des travaux de génie sanitaire, que nous n'envisagerons pas ici, et qui s'adressent à l'ensemble de la communauté sociale, la protection individuelle ou collective contre une maladie infectieuse peut être assurée soit par l'un, soit par la combinaison, des moyens sur lesquels repose la défense organique contre l'infection. Ces moyens sont les suivants:

1. la chimioprophyllaxie,
2. l'immunisation passive,
3. l'immunisation active.

En dépit des controverses qui n'ont plus qu'un intérêt historique, il n'y a pas de raisons de penser que le problème de l'immunité soit, en ce qui concerne la poliomyélite, fondamentalement différent de ce qu'il est pour les autres maladies infectieuses, à quelques facteurs près, tels que la contagion du virus et l'épidémiologie de l'infection. C'est dans cet esprit que nous aborderons le problème.

Chimioprophyllaxie

On ne dispose jusqu'ici d'aucun moyen chimioprophyllactique efficace de prévention de la poliomyélite. La multiplicité et l'étendue des portes d'entrée possibles du virus condamnent la prophylaxie locale telle qu'elle avait été proposée à un certain moment, à la suite de travaux de Schultz & Gebhardt^{67, 68} par application de substances astringentes sur la muqueuse

* Cette étude est publiée telle qu'elle a été présentée à la Conférence de Francfort-sur-le-Main en mars 1954.

olfactive. Harmon,³⁰ Toomey,⁷¹ Lépine & Levaditi⁴² ont montré que cette méthode ne donnait aucune garantie d'efficacité et qu'elle présentait des dangers certains.

Les recherches expérimentales de Lépine et al.⁴³ ont montré que les ribonucléases des venins de certains serpents assuraient chez la souris une protection significative après infection par le virus du type 2. Mais, en raison même de la toxicité du produit aucune méthode pratique ne peut en être tirée pour la prophylaxie de la poliomyélite, bien que l'application du venin de naja semble avoir donné quelques résultats dans le traitement expérimental de la poliomyélite (Sander, Akin & Soret⁶⁵).

Un grand nombre de substances naturelles ou synthétiques ont été examinées et ont fait l'objet de recherches expérimentales dans le but d'arriver à réaliser une chimioprophylaxie ou chimiothérapie de la poliomyélite. Parmi les travaux les plus récents citons ceux de Jungeblut,³² de Schnitzer, Buck & Steiger⁶⁶ sur les composés de la naphthoquinonimine, ceux de Brown & Ackermann⁹ sur l'inhibition de la culture du virus par la DL-éthionine ainsi que ceux de Gershoff et al.²¹ sur l'influence d'un régime renfermant un excès de méthionine associé à une carence en tryptophane. Mentionnons les recherches sur l'influence inhibitrice exercée sur les cultures par certains analogues des amino-acides naturels parmi lesquels, outre l'éthionine déjà citée, la thiényl-2- β alanine ainsi que des analogues de produits métaboliques de purines étudiés par Brown,⁸ en particulier la diamino-2,6 purine et la benzimidazole. Citons encore de nombreuses recherches dues à divers auteurs,^{2, 20, 36, 48, 52, 54, 72} portant sur les métabolites, les antimétabolites ou substances dérivées, qui nous fournissent des indications intéressantes sur les voies conduisant à d'éventuelles applications, mais qui, jusqu'ici, n'ont abouti à aucun résultat décisif sur lequel fonder des méthodes prophylactiques.

Les substances dérivées de cultures d'organismes producteurs d'antibiotiques (Shope,⁶⁹ Cochran et al.¹¹) se sont montrées assez décevantes. Enfin les antiseptiques, en particulier l'hexachlorophène (Klarenbeek³⁴) l'oxyde d'éthylène (Klarenbeek & Tongeren³⁵) et les antiseptiques tensioactifs (Faber & Dong^{16, 17}) présentent un indubitable intérêt dans le domaine de l'hygiène mais ne peuvent se prêter à une prophylaxie individuelle systématique.

La chimioprophylaxie a donc jusqu'ici abouti à des résultats dans leur ensemble négatifs, ce qui ne veut pas dire que les recherches actuellement poursuivies en de nombreux laboratoires ne permettront pas d'aboutir un jour à la découverte d'un corps qui permette d'assurer une prophylaxie chimique efficace, encore hypothétique, pour l'instant.

Immunisation passive

La protection des individus au moyen de l'immunisation passive est une question qui a été agitée depuis longtemps. Sans en retracer l'historique

en remontant jusqu'aux observations de Netter & Levaditi⁵¹ et aux premiers essais de Davide,¹³ il suffit de rappeler qu'elle a fait dans le passé l'objet de très nombreux travaux qui n'ont pas donné de conclusion définitive. La question a été reprise, lorsqu'il fut proposé d'appliquer à la protection des sujets sensibles la gamma-globuline (Hammon²²), produit de fractionnement du sérum humain dont l'efficacité était démontrée par les recherches expérimentales sur l'animal (Bodian,^{4,5} Rhodes & Clark⁵⁵).

Après quelques essais pratiqués sur une échelle restreinte, une vaste expérimentation a été rendue possible, en 1952, aux Etats-Unis d'Amérique sous l'égide de la National Foundation for Infantile Paralysis, et réalisée par Hammon et ses collaborateurs.^{25, 26, 27}

L'analyse finale des résultats²³ de cette première campagne a permis de tirer la conclusion suivante :

La gamma-globuline de la Croix-Rouge américaine, administrée à la dose moyenne de 0,14 ml par livre de poids corporel (0,31 ml par kg) au cours d'essais contrôlés, pratiqués dans trois zones épidémiques (Utah, Iowa-Nebraska, Texas), a assuré une protection significative contre la poliomyélite. Ces conclusions sont basées sur l'étude de 104 cas de maladies paralytiques survenues parmi un groupe total de 54 772 enfants dont la moitié (27 386) a reçu de la gamma-globuline et l'autre moitié une injection témoin de gélatine.

La période d'observation a été de 14 semaines. Les cas survenant durant la première semaine après l'injection de la gamma-globuline n'ont pas été moins nombreux chez les traités que chez les témoins; cependant, d'après les auteurs, leur gravité aurait été modifiée de façon significative.

Durant la période suivante de 4 semaines, un degré élevé, mais non complet, de protection a été mis en évidence. De la 6^e à la 8^e semaine après l'injection, la protection va en s'évanouissant, et il n'y a plus aucune protection décelable après la 8^e semaine. Ce sont bien là les caractéristiques d'une protection passive.

D'autre part, et pour vérifier la validité des groupes témoins, on a recherché s'il y avait la moindre indication que les injections de gélatine aient pu localiser ou provoquer la paralysie. Aucune coïncidence de cette sorte n'a pu être mise en évidence, et les témoins ne se sont pas comportés autrement que le reste de la population des mêmes zones, qui n'avait pas reçu d'injection: autrement dit, l'acte même de l'injection n'augmente pas le risque de poliomyélite.

En fait, lorsque l'on examine les résultats combinés pour toutes les zones, la protection assurée par la gamma-globuline a été assez marquée, le résultat de l'étude suffisamment étendu et l'incidence épidémique assez élevée pour assurer qu'en fait aucun groupe témoin n'aurait été nécessaire pour démontrer l'efficacité de la protection.

L'expérience a donc été, dans l'ensemble, un succès, et elle paraît au premier abord très encourageante.

Il ne faut cependant pas se dissimuler que l'emploi de la gamma-globuline comporte des limitations sur lesquelles Hammon lui-même²³ a mis l'accent. Ce sont essentiellement les suivantes :

La rareté de la gamma-globuline, d'une part, son prix de revient élevé d'autre part, et enfin la courte durée de la protection passive assurée, excluent toute idée d'application généralisée de la méthode à toute une population, et plus encore celle de la répétition systématique indiscriminée des injections de gamma-globuline à titre de mesure de protection.

On est donc conduit à en restreindre l'application à la période des épidémies, à des foyers d'infection définis et, dans ces foyers, aux groupes d'âge et aux individus les plus exposés à la contamination. Ainsi, l'emploi de la gamma-globuline devra nécessairement être limité aux contacts et à l'entourage familial des malades, aux communautés infectées (classes, garderies, maternités) et à certains individus (femmes enceintes, très jeunes enfants).

Le fait qu'il ne soit pas actuellement possible de déterminer à l'avance quels sont, dans une population, les individus réceptifs qui peuvent contracter la poliomyélite, et ceux qui sont déjà immuns et ne risquent pas de la contracter, conduit à injecter la gamma-globuline non seulement à des sujets qui ne seront peut-être pas contaminés, mais aussi à des sujets qui, même contaminés, ne feraient pas de paralysies. Quelle est donc la proportion des injections faites qui se montrent réellement efficaces ?

Les expérimentateurs américains ont pu essayer leur méthode dans des foyers épidémiques où le taux de morbidité atteignait 400 pour 100 000 habitants. Ils estiment, dans ces conditions, que la gamma-globuline a réellement protégé contre la paralysie dans un cas sur 250-300 injections pratiquées. Si le taux de morbidité avait été celui de l'ensemble des Etats-Unis, la protection réelle correspondrait à une protection de 1 sur 2 000 injections pratiquées. La proportion serait encore beaucoup plus faible dans la plupart des pays européens.

Même si l'on pouvait limiter les injections faites aux contacts certains, il n'en resterait pas moins que la majorité des injections faites seraient inutiles, car nous avons vu que la protection n'est assurée qu'au bout d'une semaine, et nous savons par les études statistiques que c'est durant ce temps que surviennent 90% des cas secondaires autour d'un cas reconnu. La prophylaxie en milieu infecté ne s'adresse donc qu'à 10% des cas secondaires qui surviendraient après une semaine.

Rappelons ici l'excellente étude statistique faite par Hemmes.³¹ Cet auteur a démontré — en appliquant à la Hollande les chiffres de Hammon, et en supposant que pendant l'épidémie de 1952 les 53 600 enfants du Limbourg auraient reçu au total 210 litres de gamma-globuline — que le nombre des décès, qui a été de 18, serait tombé à 17, ou à 14 ou 15 suivant le moment où les injections auraient été pratiquées, et que le nombre des paralysies avec séquelle, qui fut de 56, ne se serait abaissé qu'à 42 ou 43,

en raison de l'efficacité réduite des globulines administrées moins de huit jours avant l'éclosion de la maladie.

Cette manière de voir est confirmée par les résultats les plus récents de l'application de la gamma-globuline à la prophylaxie de la poliomyélite, qui a eu lieu aux Etats-Unis au cours de la saison 1953.⁷⁵ Au cours de ces essais, justifiés par les résultats obtenus en 1952, qui viennent d'être exposés plus haut, en 13 Etats différents, 255 000 enfants ont reçu des inoculations préventives de gamma-globuline dans 23 communautés soumises à l'observation. L'analyse finale des résultats montre qu'il n'y a pas de différence sensible entre le groupe des enfants traités et celui des enfants témoins. C'est ainsi qu'en totalisant les résultats de cinq comtés, on a observé 43 cas de poliomyélite chez les témoins contre 48 chez les traités.

Comment expliquer cette différence entre les résultats de 1953 et ceux de 1952 ? Il est bien évident que l'administration de gamma-globuline à des groupes aussi étendus que ceux de 1953 a entraîné l'application à des cas moins sélectionnés que dans l'expérience de 1952, et que l'on peut même objecter que le diagnostic de poliomyélite, établi chez les témoins comme chez les traités a été, dans certains cas, mis en question. Il n'en reste pas moins que les conditions d'application de la gamma-globuline aux Etats-Unis ont été plus proches en 1953 qu'en 1952 des conditions réelles, en cas de généralisation et d'application courante de la méthode. Cette expérience permettait en particulier de se rendre compte si l'application de la gamma-globuline aux contacts dès l'apparition d'un cas survenant dans une famille ou une communauté restreinte permettrait de réduire le nombre de cas auquel on devait s'attendre. Les résultats n'ont pas répondu à l'attente, et selon le résumé du Comité consultatif publié dans *Public Health Reports* ⁷⁴

« Aucun effet bénéfique n'a pu être démontré par l'application de la gamma-globuline à des injections en masse d'enfants pratiquées dans des zones épidémiques ou par l'injection à des membres de la famille de malades atteints de poliomyélite... Cependant les chiffres recueillis ont montré que l'injection de gamma-globuline aux contacts familiaux dès l'apparition d'un premier cas de poliomyélite dans un foyer familial n'a pas réduit le nombre ultérieur de cas dans ces foyers de même que l'injection à des personnes exposées avant qu'elles ne soient atteintes de poliomyélite paralytique n'a entraîné aucun effet notable sur la paralysie ». [Trad.] ^a

C'est donc en définitive et en pratique à un échec complet de la prophylaxie de la poliomyélite par les globulines que nous assistons sur le terrain pratique, bien que, sur le plan théorique, elle ne soit pas dénuée d'intérêt,

^a « ... no beneficial effects were demonstrated from the use of gamma globulin in the mass inoculation of children in epidemic areas or from inoculation of members of the families of poliomyelitis patients »...

« However, the data collected showed that inoculation of family contacts with gamma globulin as soon as the first case in a household was recognized did not reduce the number of subsequent cases in the household nor did the inoculation of exposed persons before they developed paralytic poliomyelitis produce a measurable effect on the paralysis. »

et qu'elle ait contribué, en particulier, à montrer qu'un faible taux d'anticorps pouvait suffire à empêcher l'apparition de la paralysie — constatation qui revêt toute son importance à propos de la vaccination.²⁹

Cela veut-il dire que toute injection de gamma-globuline qui n'aura pas empêché l'apparition d'une paralysie aura été faite en pure perte ?

La réponse ne peut être que nuancée, car nous ignorons encore dans quelle mesure l'éventualité d'une contamination chez un sujet temporairement protégé par l'immunisation passive favorise, retarde ou empêche l'établissement d'une immunité active. C'est là une question qui sera discutée plus loin à propos de l'immunisation par la vaccination (voir ci-dessous).

Expérimentalement, Hammon, Cheever & Sather²⁴ ont montré que la protection passive des souris, au moyen de gamma-globuline humaine, contre une infection par la souche MEF1 du virus 2, n'empêche pas l'établissement d'une immunité active. Il y a lieu de croire que le même phénomène intervient chez l'homme, et que l'absence apparente de poliomyélite dans les communautés ou les groupes de populations où l'hygiène est insuffisamment développée (populations indigènes de l'Afrique du Sud ou d'Okinawa, fellahs d'Égypte) tient, comme le font ressortir les études aujourd'hui classiques de Gear, de Hammon, de Paul et d'autres auteurs, à une infection très précoce de l'enfant au cours du premier âge, alors qu'il est encore protégé passivement par les anticorps maternels, reçus par la voie placentaire et peut-être aussi par l'allaitement au sein.

Ainsi, l'application la plus logique des gamma-globulines nous conduit-elle directement à l'étude de l'immunisation active, seul espoir que nous puissions avoir, à l'heure actuelle, d'arrêter l'extension du fléau.

Immunisation active : vaccination

Dès l'isolement, par Landsteiner et Popper, en 1909, du virus de la poliomyélite infectieuse, tous les espoirs se sont tournés vers la découverte d'une vaccination efficace. Cependant, quarante ans de travaux n'avaient guère fait avancer le problème.

On trouvera l'essentiel des résultats acquis jusqu'à la période récente dans la revue étendue, encore qu'incomplète, consacrée récemment par Boyd⁷ à la vaccination contre la poliomyélite. Le caractère décevant de l'analyse de plusieurs centaines de travaux, où se retrouvent les noms des chercheurs les plus éminents, tient pour une part à des raisons techniques : rareté et prix élevé des singes, conduisant à des essais limités à des groupes réduits d'animaux ; insuffisance des méthodes de titrage du virus et des anticorps ; ignorance de la multiplicité des types antigéniques du virus, insuccès des méthodes de production *in vitro* du virus. Ces raisons techniques sont aujourd'hui en grande partie surmontées.

Mais, pour aboutir à une méthode pratique de vaccination, il reste encore à résoudre les obstacles les plus sérieux, inhérents au problème, et qui, depuis longtemps mis en évidence³⁹ constituent le cœur du sujet.

Le problème peut, au premier abord, paraître relativement simple. Il s'agit, en somme, d'imiter ce que fait la nature parmi les populations où l'hygiène est peu développée, ou aux niveaux les moins favorisés des régions économiquement plus développées, en assurant une immunisation spontanément acquise de la quasi-totalité des sujets. Nous savons aujourd'hui que cette immunisation a lieu à la faveur d'infections inapparentes et à un âge assez précoce pour que le risque de paralysies devienne, en fait, négligeable. Cela est dû en partie, très probablement, au fait de la persistance chez le nouveau-né d'anticorps maternels reçus par voie placentaire et qui permettent à l'organisme une immunisation active sous le couvert de la protection passive maternelle.

La solution cherchée consiste à reproduire chez l'enfant, particulièrement dans les pays où l'hygiène est en progrès marqué, ce que la nature fait spontanément chez les enfants des régions moins développées, c'est-à-dire l'établissement d'une immunité contre les trois types du virus, ceci sans avoir à payer le tribut de l'immunisation naturelle représenté par les poliomyélites paralytiques qui surviennent chez un petit nombre des enfants spontanément infectés.

En fait, le problème est d'une complexité extrême, car l'expérimentateur cherchant à mettre au point une méthode pratique doit lutter contre d'importants facteurs défavorables dont il ne lui est pas possible de sous-estimer l'importance.

Le premier de ces obstacles est d'ordre pratique: le virus poliomyélique, comme les autres virus, ne se développe pas sur les milieux bactériologiques usuels. Mais alors que d'autres virus, comme le virus grippal ou celui de la psittacose, peuvent être obtenus en quantités quasi illimitées grâce à des méthodes de culture relativement simples dans l'œuf de poule incubé, le virus poliomyélique n'a pu être adapté de façon satisfaisante, jusque tout récemment, qu'à des cellules vivantes d'espèces animales sensibles, c'est-à-dire essentiellement d'homme et de singe. Tant que le singe a été le seul réactif utilisable, le prix élevé de cet animal, et plus encore la faible quantité de virus recueilli dans son système nerveux, ont été un obstacle infranchissable à l'obtention des grandes quantités de virus indispensables à la production d'un vaccin.

En 1951, Enders et ses collaborateurs, à Boston, aboutissaient à la culture *in vitro* du virus poliomyélique sur cellules empruntées à des embryons humains, et susceptibles de multiplication indéfinie dans des milieux de composition relativement simple. Leur technique, élégante et précise, s'appuyait sur un fait déjà démontré par Levaditi en 1913⁴⁵ mais oublié depuis lors, à savoir que, contrairement à l'affirmation que seul le système nerveux pouvait offrir un milieu de culture favorable (Sabin & Olitsky)⁶⁰

des cellules non nerveuses, et en particulier les fibroblastes, pouvaient non seulement être infectées par le virus mais encore assurer sa croissance illimitée à travers un nombre indéfini de transferts. De nombreuses techniques sont dérivées de cette méthode. Les plus intéressantes sont celles qui emploient des cellules rénales de singes (Youngner, Ward & Salk ⁷⁶, des amygdales humaines d'adultes (Barski et al. ¹) ou différentes souches de cellules tumorales d'origine humaine (Syverton ⁷⁰).

Les propriétés mêmes du virus constituent d'autres obstacles plus sérieux encore. Tout d'abord, le virus est un antigène médiocre qui suscite pour une même dose des réponses individuelles irrégulières et souvent transitoires. Rien de comparable à la solide et constante réponse de l'organisme au virus vaccinal, par exemple. La grande résistance dont font preuve certaines populations vis-à-vis du virus tient non seulement à leur immunisation précoce au cours de la première enfance mais encore et peut-être plus à de fréquentes réinfections tout au long de la vie. C'est du reste à l'absence de ces réinfections chez les populations plus évoluées qu'il faut attribuer l'ascension régulière de l'âge de la poliomyélite à laquelle nous assistons aujourd'hui. Il en résulte, à la fois, que des quantités élevées de virus seront nécessaires pour vacciner un sujet, et que l'immunisation de ce dernier risque d'être de courte durée.

Un obstacle supplémentaire réside dans le fait que la clinique et l'épidémiologie comme l'expérimentation ont depuis longtemps démontré que chez les sujets normaux, la résistance acquise au virus poliomyélitique est sujette à d'importantes fluctuations en fonction de facteurs physiologiques, endocriniens, climatiques et saisonniers (Hornus ³²). Si donc on peut compter sur un niveau moyen d'immunité acquise pour l'ensemble d'une population, comme on peut le faire en matière de diphtérie par exemple, il est plus difficile de définir pour un individu donné le degré de son immunité, naturelle ou acquise.

Enfin, l'existence de plusieurs types antigéniques du virus de la poliomyélite, expérimentalement démontrée à partir de 1950, a été confirmée par l'isolement et le typage d'un grand nombre de souches dans le monde entier.

Celles-ci peuvent toutes être ramenées à trois types antigéniques n'ayant pas entre eux d'immunité croisée.

Les premiers résultats en 1951 ⁷³ avaient montré que les différents types étaient répartis comme suit: type 1, 85%; type 2, 12%; type 3, 3%. En 1953, les résultats de Pait et al. ⁵³ indiquaient: type 1, 80%; type 2, 6%; type 3, 14%. Pour la France par exemple, la proportion des différents types (Lépine, Barski, Endo & Blusson ⁴¹) est de 78% pour le type 1, 6% pour le type 2 et 16% pour le type 3.

Avec des variations en plus ou en moins, des résultats analogues ont été trouvés dans les différents pays, de sorte que l'on peut dire qu'à l'heure actuelle, dans l'ensemble, 80% environ des poliomyélites sont dues

au type 1, 5-8% au type 2 et 12-15% au type 3. Seul le type 1, le plus courant et le type 3 plus rare, ont été rencontrés dans les grandes épidémies. Le type 2 ne paraît être responsable que de cas sporadiques ou limités à de petits groupes; mais il semble bien, par rapport aux deux autres types, déterminer une fréquence plus grande des formes encéphalitiques, à localisation du type supérieur ou à symptomatologie atypique. Les types 2 et 3, primitivement considérés comme rares, semblent bien augmenter de fréquence, de sorte que c'est, en définitive non pas une seule, mais trois méthodes de vaccination qu'il s'agit de mettre au point pour des virus ayant des propriétés et des affinités différentes.

Reste un obstacle qui n'est pas le moindre. Si inquiétante que soit la poliomyélite au stade actuel de son évolution, elle n'en demeure pas moins encore une maladie relativement rare et contre laquelle la très grande majorité des individus s'immunise spontanément à la faveur d'infections inapparentes. En France, par exemple, les chances qu'a un individu de contracter la poliomyélite ont été, au cours des dix dernières années et pour l'ensemble de la population de 3,3 pour 100 000 en moyenne.

Il en résulte une double constatation, l'une d'ordre déontologique, l'autre d'ordre épidémiologique, ayant toutes deux des incidences d'ordre pratique. La première, c'est que, quelle que soit méthode d'immunisation adoptée, les risques d'accidents qu'elle entraînera (inhérents à toute méthode de vaccination) ne devront en aucune cas être égaux ou supérieurs aux chances de contracter la poliomyélite. La deuxième, c'est que pour juger toute méthode de vaccination, sur le plan de son efficacité comme sur celui de son innocuité, les groupes d'individus essayés devront être tels que les différences statistiques échappent à l'influence du hasard. C'est-à-dire, en fait, qu'il faudra vacciner plusieurs centaines de milliers d'individus pour pouvoir observer une différence significative avec la portion non vaccinée de la population. Même en sélectionnant les groupes d'âges les plus réceptifs, les chiffres à observer restent plusieurs milliers de fois plus élevés que pour toute méthode vaccinale tentée jusqu'ici si l'on doit s'en tenir aux seules méthodes statistiques d'appréciation des résultats.

Si l'on peut estimer pour la France qu'un groupe indiscriminé de 250 000 individus (sur lesquels il y aurait chance d'observer en temps d'épidémie, en moyenne de 7 ou 8 cas de poliomyélite) pourrait à la rigueur constituer un groupe minimum d'individus à vacciner, pour des régions plus méridionales telles que les pays d'Afrique, ces chiffres devraient être multipliés par quatre ou cinq au moins.

Ceci dit, quelles sont les méthodes qui peuvent être actuellement envisagées, dans l'ordre théorique comme dans l'ordre pratique? Quelles sont, parmi elles, celles qui ont été l'objet de contrôles expérimentaux, et quelles sont celles dont on peut espérer qu'elles atteindront bientôt le stade pratique de l'application?

A considérer la question d'un point de vue purement théorique, trois voies s'ouvrent à nous dans la recherche d'une immunisation active contre la poliomyélite et l'obtention d'un vaccin pratiquement utilisable. Ce sont les suivantes :

1. l'emploi de souches *virulentes, inactivées*, c'est-à-dire l'injection d'un virus tué, dont l'effet immunisant peut être renforcé par la présence d'adjuvants ;
2. l'emploi de souches *atténuées*, c'est-à-dire l'administration par voie digestive d'un virus vivant apathogène ;
3. l'emploi de souches *neutralisées*, c'est-à-dire l'immunisation par un virus actif sous couvert d'une protection passive assurée au moyen d'anticorps spécifiques.

Souches virulentes inactivées

L'emploi des souches actives pleinement virulentes du virus poliomyélique, tuées ou plus exactement inactivées pour pouvoir servir de vaccin, implique que l'on dispose de quantités abondantes du virus (en réalité de chacun des trois types du virus) au maximum de sa virulence ; le vaccin devra être administré par injections, comme l'est un vaccin antityphoïdique par exemple.

Le problème est alors centré sur la culture du virus *in vitro*. Il nous faut en effet, renoncer à l'idée, autrefois envisagée, d'utiliser le système nerveux d'animaux tels que singes, ou à la rigueur muridés, inoculés avec le virus, car l'injection d'un vaccin renfermant du tissu nerveux hétérologue exposerait à de graves accidents d'encéphalomyélite démyélinisante (ou leuconévrite allergique). L'obstacle jusqu'ici rencontré dans la réalisation des cultures *in vitro* est représenté non par le virus, mais par les cellules vivantes qui doivent lui servir de support.

L'accord est à peu près unanime pour éliminer d'emblée les techniques faisant appel à des cellules humaines d'origine tumorales (souche HeLa en particulier). Notre connaissance du déterminisme du cancer chez l'homme est encore trop restreinte pour que l'on courre le risque d'injecter des cellules de nature maligne, même tuées. Il nous reste donc le choix entre les techniques employant le rein de singe et celles utilisant des cellules humaines normales, adultes ou embryonnaires. Les premières de ces techniques soulèvent le risque de faire apparaître, éventuellement, chez les sujets ayant reçu des cellules hétérologues, des anticorps anti-Rh ou anti-organes (anti-rein dans le cas particulier). Les secondes se heurtent soit à des obstacles pratiques (difficulté d'obtention des embryons humains dans la plupart des pays d'Europe) soit à des obstacles techniques (lenteur du rythme de multiplication des cellules humaines adultes).

Enfin, quelques auteurs émettent l'hypothèse, non confirmée, jusqu'ici, que toute cellule en culture *in vitro* acquiert ipso facto un caractère

néoplasique (multiplication illimitée, perte progressive de la différenciation cellulaire spécifique), ce qui constituerait une restriction supplémentaire.

Il semble possible, comme nous le verrons plus loin, de surmonter ces obstacles, mais il n'en reste pas moins que la principale objection formulée contre les vaccins tués est le fait qu'ils confèrent une immunité de plus courte durée que celle qu'assurent les vaccins vivants. D'où la nécessité éventuelle d'une revaccination périodique ou d'injections de rappel pratiquées à des intervalles dépendant à la fois du taux des anticorps obtenus lors de la primo-vaccination et du rythme d'élimination de ces derniers.

Souches vivantes atténuées

Le principe de la vaccination au moyen de souches vivantes atténuées a pour lui deux arguments majeurs : *a*) le fait que les meilleures vaccinations contre les virus ont jusqu'ici été obtenues avec des vaccins constitués par des souches atténuées vivantes (vaccination antirabique de l'homme avec le virus fixe de Pasteur, ou du chien avec le virus rabique avianisé, vaccination contre la fièvre jaune avec la souche mutée 17D, etc.) ; *b*) le fait que ce mode de vaccination reproduirait le processus naturel d'immunisation, car le virus atténué serait administré par la voie digestive et l'immunisation active ainsi obtenue selon le même mécanisme tissulaire que celui qui conduit à l'immunisation spontanée.

De nombreux chercheurs se sont lancés dans cette voie ; nous ferons plus loin allusion aux travaux les plus marquants actuellement connus. Quels qu'en soient les résultats, les deux obstacles principaux n'ont pas encore pu être entièrement surmontés : d'une part, bien que des mutations de virus aient été obtenues et dans des conditions plus qu'encourageantes, on n'a pas obtenu jusqu'ici la mutation simultanée ou l'atténuation au même degré de *chacun* des trois types antigéniques de virus, de sorte que, en mettant les choses au mieux, les méthodes restent incomplètes. D'autre part, nous n'avons pas encore la preuve absolue que la mutation qui a conféré aux souches expérimentées une innocuité suffisante est définitive et irréversible, bien que des arguments de poids permettent de penser qu'il en est bien ainsi.

Il nous faut considérer, en effet, qu'aucun expérimentateur n'a pu encore essayer de telles souches sur un nombre d'animaux équivalant à celui d'un groupe minimum de population qui, nous l'avons vu, est nécessaire pour affirmer que le risque d'accidents dus au vaccin n'est pas supérieur aux risques d'infection par la maladie naturelle. Enfin, administrer un virus vivant par la voie digestive veut dire qu'il y a les plus grandes chances pour que ce virus modifié soit diffusé spontanément parmi la population dans les mêmes conditions où serait propagé un virus poliomyélitique normal à la faveur d'une infection apparente ou non. Il faut donc être certain que la transmission naturelle, c'est-à-dire le passage

direct d'homme à homme du virus muté ne pourra pas lui restituer à un moment donné sa virulence originelle.

Souches neutralisées

Il s'agit de l'*immunisation par un virus actif*, plus ou moins modifié, administré par injection ou par ingestion *sous le couvert d'une immunité passive temporaire* obtenue grâce à l'emploi d'anticorps spécifiques, de gamma-globulines en particulier. C'est le principe général des « vaccins sensibilisés » que connaissent bien les vétérinaires mais dont l'emploi est aujourd'hui en régression en médecine animale après avoir été pratiquement abandonné en médecine humaine, car les difficultés pratiques de mise au point de la méthode en contrebalançant le plus souvent les avantages théoriques. On peut cependant se demander, dans le cas de la poliomyélite, si la présence d'anticorps circulants pendant la phase d'immunisation active ne contribuerait pas à limiter le neurotropisme potentiel du virus et à éviter ainsi les conséquences paralytiques de l'infection.

DISCUSSION

Toutes les méthodes jusqu'ici proposées ou essayées procèdent de l'une de ces trois positions de départ théoriques. Il n'est pas impossible de concevoir qu'une méthode pratique puisse résulter de la combinaison de deux des méthodes fondamentales : par exemple, une immunisation de base par vaccin tué, injecté, renforcée en un second temps par un vaccin actif, ingéré. Ou encore, une immunisation primaire obtenue par immunisation active et passive combinées, ultérieurement entretenues par un vaccin tué ou par un vaccin vivant.

Quel que soit le procédé de vaccination finalement retenu sur des bases expérimentales solides, il doit, avant d'être applicable à des essais sur l'homme, avoir fait la preuve, d'une part, de son innocuité, d'autre part, de son efficacité. Or, nous trouvons ici une démonstration supplémentaire des difficultés rencontrées.

Evaluation de l'efficacité d'un vaccin

Quels moyens avons-nous, en effet, pour juger qu'une méthode de vaccination antipoliomyélique est efficace chez l'homme ?

Si nous nous contentons des données statistiques, il nous faut, nous l'avons dit, faire l'essai sur plusieurs centaines de milliers d'individus, ce qui suppose préalablement résolu le problème de l'innocuité. Si nous voulons des preuves positives, nous devons nous contenter d'analogies avec ce qui se passe chez l'animal, puisqu'il n'est pas question, bien entendu, d'inoculer un virus pathogène chez nos vaccinés pour éprouver leur état d'immunité.

L'expérience nous montre, chez le singe, que l'administration d'un vaccin efficace (c'est-à-dire déterminant une immunité active permettant à l'animal de résister victorieusement à l'inoculation d'épreuve faite ultérieurement) s'accompagne de l'apparition dans son sérum d'anticorps spécifiques capables de neutraliser *in vitro* la ou les souches employées pour la vaccination comme les souches-types de chacun des trois types antigéniques. Il semblerait donc que la recherche des anticorps et l'observation du rythme de leur apparition puissent servir de moyen de contrôle et de mesure de l'état d'immunité du sujet vacciné. C'est-à-dire que l'on est habituellement conduit à raisonner par analogie selon le syllogisme suivant :

a. la vaccination, comme l'infection naturelle, fait apparaître des anticorps dans le sérum des sujets vaccinés ;

b. or les singes qui présentent un certain niveau d'anticorps sont protégés contre l'infection poliomyélitique par la voie digestive, sous-cutanée, intramusculaire et même par la voie intracérébrale ;

c. donc les sujets humains présentant le même taux d'anticorps que les singes à la suite d'une vaccination par la même méthode atteignent au même degré de protection.

Bien qu'il soit très probable qu'un tel syllogisme réponde à la réalité, nous ne pouvons cependant pas affirmer qu'aucun de ces trois termes repose sur des faits définitivement prouvés.

Il est en effet exact que l'introduction d'un antigène poliomyélitique dans un organisme détermine la production d'anticorps spécifiques, et en particulier d'anticorps circulants dans le sérum. Il est également exact que la répétition des injections d'antigène entraîne une élévation, proportionnelle dans une certaine mesure, du taux de ces anticorps ; mais nous ne pouvons néanmoins pas considérer les anticorps comme mesurant directement et effectivement le degré de la résistance à la paralysie que nous savons être surtout une résistance d'ordre tissulaire. Tout ce que nous pouvons dire, c'est que la résistance tissulaire s'accompagne de la production d'anticorps circulants et que, dans les conditions usuelles, plus cette résistance est élevée, plus le taux des anticorps circulants est lui-même élevé. Mais d'innombrables expériences montrent, d'une part, que l'état réfractaire à l'infection poliomyélitique, surtout dans les cas où la contamination a lieu par la voie digestive, peut parfaitement s'observer concurremment avec un taux très bas, voir négligeable, d'anticorps dans le sérum ; d'autre part, même chez les animaux ayant un taux élevé d'anticorps, on peut à la faveur de modifications des facteurs physiologiques et endocriniens dont il a été question plus haut, faire fléchir la résistance acquise. Nous devons donc penser qu'il doit pouvoir en être de même chez l'homme, et que son immunité, dans les conditions variées auxquelles il est soumis durant son existence, peut être sujette à des fluctuations du même ordre que celle des animaux d'expérience.

Il est également exact, dans l'ensemble, qu'un taux suffisant d'anticorps permet de protéger l'animal contre des doses modérées de virus introduit par les voies courantes. Le désaccord commence lorsque l'on veut définir cette dose suffisante. Chez le chimpanzé on observe habituellement que l'animal est protégé contre l'infection par la voie digestive lorsqu'un taux d'anticorps de 1 : 10 ou plus (pour neutraliser 50 à 100 DP₅₀ de virus) est rencontré dans le sérum, mais il faut des taux d'anticorps beaucoup plus élevés pour le protéger de l'infection par la voie intramusculaire et plus encore par la voie cérébrale. Chez le cynomolgus (*Macaca irus*) il faut souvent un taux d'anticorps moins élevé que chez le chimpanzé pour protéger l'animal contre l'infection par voie digestive, alors qu'il n'est pratiquement pas possible d'infecter par la voie digestive le rhesus qui résiste à ce mode de contamination, qu'il ait ou non des anticorps. Chez les singes inférieurs, on est donc obligé de prendre pour infection d'épreuve servant de test à la résistance non pas l'infection par voie digestive mais celle par voie intra-musculaire ou intracérébrale qui représente un mode anormal d'infection puisque le virus est, dans ces cas, directement mis en contact avec le système nerveux ou ses terminaisons intramusculaires.

Dans ces conditions, chez le rhesus ou chez le cynocéphale, un taux d'anticorps sérique de 1 : 32 protège d'une façon régulière l'animal contre l'infection par voie intramusculaire. Il le protège habituellement, mais non toujours, contre l'inoculation par la voie intracérébrale. On peut donc arbitrairement admettre que chez le singe, un taux de 1 : 32 représente un taux raisonnable d'anticorps, de l'ordre de celui qui semble souhaitable pour contrôler expérimentalement l'efficacité d'un vaccin antipoliomyélique.

Nous avons peu de bases pour fixer le taux minimum d'anticorps qui accompagne régulièrement l'immunité poliomyélique chez l'homme et qu'il conviendrait par conséquent d'obtenir à la suite de la vaccination. Les examens pratiqués chez des convalescents de poliomyélite, que l'on peut supposer avoir acquis une sérieuse immunité à la suite d'une infection récente, donnent des résultats souvent contradictoires et on observe habituellement une grande variation dans les taux enregistrés (Lépine & Pavilanis ⁴⁴). Néanmoins, l'examen montre que ces taux sont, dans l'ensemble, supérieurs à 1 : 20; de sorte que là encore, on est conduit à admettre que l'apparition d'un taux d'anticorps de 1 : 32 chez l'enfant correspond vraisemblablement à l'état réfractaire vis-à-vis de l'infection paralytique.

Il faut rappeler une fois de plus que la vaccination contre la poliomyélite est dirigée avant tout contre les conséquences paralytiques de l'infection plus que contre l'infection elle-même. En effet, si l'infection poliomyélique ne se manifestait que par la maladie inapparente, voire même seulement par les formes non paralytiques de l'infection mineure, le

problème de la vaccination ne se poserait pas. D'autre part, l'expérience sur l'animal montre que les cynomolgus et les chimpanzés qui ont été immunisés contre la poliomyélite et que l'on réinfecte par voie buccale font habituellement, à la suite de cette contamination, une infection intestinale sans symptômes avec élimination de virus poliomyélitique, d'une durée plus réduite que dans le cas d'une primo-infection. A la suite de cette réinfection, on voit s'élever le taux des anticorps qui préexistaient du fait de la vaccination antérieure.

Il semblerait donc que, en réussissant à établir chez l'homme un niveau d'anticorps suffisant pour prévenir l'apparition de la paralysie, on n'empêchera pas nécessairement (et il ne serait peut-être pas toujours souhaitable d'empêcher) l'éventualité d'une réinfection par voie digestive, laquelle demeurerait asymptomatique mais serait susceptible d'agir en exerçant un effet de rappel sur le degré de l'immunité produite par la vaccination. Il en résulte que le problème de la vaccination chez l'homme se présente de façon différente suivant que l'on s'adresse à une population pour laquelle les chances de réinfection fréquentes et répétées sont grandes, ou que l'on s'adresse à une population qui, du fait des conditions d'hygiène, de l'isolement ou de toute autre cause, se trouve peu exposée à des réinfections, celles-ci pouvant ne survenir qu'après des délais prolongés au cours desquels l'immunité induite par la vaccination, et non entretenue par des infections latentes, peut avoir fléchi ou avoir disparu. Il est de ce fait parfaitement possible que des résultats discordants soient dans l'avenir enregistrés lorsque l'on procédera à des essais de vaccination de différentes populations, et que suivant les zones endémo-épidémiques où les expérimentateurs auront pu opérer l'immunité active due à la vaccination soit dans un cas considérée comme solide et durable et dans l'autre comme transitoire et insuffisante.

Néanmoins, et pour essayer de fixer des standards de comparaison entre les différentes méthodes de vaccination possibles, il semble que l'obtention chez l'enfant ou l'homme vacciné, d'un taux d'anticorps sériques d'environ 1 : 32 représente un objectif souhaitable encore qu'il soit probable, surtout parmi les populations exposées à des réinfections que des taux inférieurs (mais supérieurs à 1 : 10) soient capables de protéger l'organisme contre les conséquences paralytiques d'une infection par un virus poliomyélitique.

Retenons de cette discussion que notre seul élément pratique d'appréciation de l'immunisation chez l'homme repose sur un facteur, l'apparition des anticorps ou l'élévation de leur taux s'ils préexistaient, où nous ne pouvons voir qu'une indication mais non une mesure exacte de l'état d'immunité en tant que résistance à l'infection ou à la réinfection.

Cette restriction faite, et elle est d'importance, quelles sont parmi les méthodes possibles celles dont on peut estimer qu'elles ont déjà dépassé le stade purement expérimental ?

Vaccination par virus tués

Dans l'ordre des vaccins tués, les études les plus avancées sont indiscutablement celles de Salk et ses collaborateurs, à Pittsburgh.^{61, 64} Les recherches de Salk ont été conduites avec des cultures de chacun des trois types antigéniques du virus, faites sur cultures de tissus à base de rein de singe, le virus étant inactivé au formol et administré par voie parentérale en émulsion avec un adjuvant composé d'un mélange de Bayol et d'Arlacel (une huile minérale et un émulsionnant) dont l'efficacité a déjà été éprouvée dans la vaccination antigrippale préalablement réalisée par le même auteur.

Sabin qui a analysé les résultats de Salk dans un travail d'ensemble,⁵⁷ estime que nous manquons encore de bases pour juger de la quantité de virus inactivé nécessaire pour produire un niveau suffisant d'anticorps et que nous ignorons la durée de l'immunité ainsi obtenue. On peut se demander, du reste, au cas où l'immunité serait de courte durée s'il ne serait pas possible de la renforcer, en un deuxième temps, par une méthode de vaccination au moyen d'un virus actif. Cox,¹² d'autre part, a formulé des critiques dont l'essentiel est résumé plus loin.

Expérimentalement, Salk a donné par ses essais nombreux sur le singe des preuves suffisantes de l'efficacité de sa méthode de vaccination. Mais, lorsqu'il s'est agi de passer aux applications, l'innocuité de cette dernière a été mise en question par la commission chargée aux Etats-Unis des essais de vaccination, ceci sur la base de trois arguments: a) la présence possible de cellules rénales d'origine simienne dans le vaccin. Il semble que la méthode de filtration utilisée suffise à éliminer ces dernières en tant que telles. Mais nous ignorons dans quelle mesure les constituants cellulaires vraisemblablement présents dans la phase liquide du milieu dont se compose le vaccin ont conservé leur spécificité zoologique; b) l'inactivation du virus par le formol. Il semble établi que dans ses premiers essais sur le singe, le vaccin de Salk renfermait encore du virus à l'état actif et que cette fraction active a pu être responsable de l'immunisation des animaux. En raison de la possibilité d'existence dans le milieu de culture d'autres virus apportés par les cellules animales (et en particulier du virus dit virus B, très fréquent chez le singe rhésus et hautement pathogène pour l'homme), il a été décidé de doubler la quantité de formol primitivement prévue dans le vaccin et de renforcer les épreuves d'inactivation du virus; c) l'emploi d'adjuvant à base d'huiles minérales a soulevé une vive critique qui, pour être théorique, n'en est pas moins grave. C'est le risque d'une action carcinogène à longue échéance qui pourrait être engendré par l'injection de telles huiles chez l'homme. Bien que l'on n'ait pu démontrer par inoculation à l'animal la présence dans les huiles hautement raffinées employées par Salk de principes cancérigènes que l'on sait exister dans certains hydrocarbures, l'argument a paru d'un poids suffisant pour que la commission rejette l'emploi de tels adjuvants au cours des premiers essais d'application à l'homme.

Le vaccin nouvelle formule employé par Salk en 1954 paraît répondre à ces différentes objections. En effet:

a) A la méthode primitive de culture sur fragments d'organes en suspension dans le liquide nutritif (méthode d'Enders, dérivée de celle de Maitland & Maitland), a été substituée la méthode de culture en couches monocellulaires de cellules sensibles trypsinées suivant le procédé de Dulbecco.¹⁴ Il en résulte que la quantité de cellules mises en jeu pour la culture est extrêmement réduite par rapport à celle de la méthode primitive; ainsi des taux plus élevés du virus sont obtenus en partant de poids plus réduits de matériel cellulaire, de sorte que finalement le contenu en protéines étrangères du vaccin paraît être inférieur au taux minimum déterminant des phénomènes de sensibilisation.

b) La même raison a permis de se passer de l'emploi d'adjuvants, et le vaccin de Salk actuel se compose uniquement du virus inactivé en suspension dans un milieu de culture filtré.

c) L'inactivation par le formol a été l'objet d'une étude serrée par Salk et al.⁶³ en même temps que la dose du formol était augmentée de 1 pour 8 000 à un 1 pour 4 000. Les courbes d'inactivation contrôlées au cours de la préparation du vaccin ont une pente suffisamment régulière pour que l'on puisse déterminer à l'avance le point où il y a une probabilité suffisante que toutes les particules de virus aient été inactivées, de sorte que le vaccin puisse être considéré comme dénué de nocivité sur l'examen d'une partie aliquote de la préparation.

Le vaccin de Salk sera en 1954 injecté à un nombre d'enfants primitivement fixé à 500 000, porté depuis à 1 million. Bien que ce soit un vaccin sensiblement différent de celui qui a fait l'objet des premiers travaux expérimentaux rapportés par Salk en 1953 il semble que les modifications dont il a été l'objet correspondent à des améliorations certaines. Il convient en tout cas d'attendre les résultats de l'expérience américaine avant de se prononcer définitivement sur sa valeur.

D'autres vaccins tués, préparés selon le même principe général que le vaccin de Salk, font l'objet d'une expérimentation serrée avant d'être proposés à l'essai humain. En Suède, où la législation permet l'obtention d'embryons humains en nombre suffisant pour des applications pratiques, Gard et ses collaborateurs préparent un vaccin de culture tué, d'un titre élevé, qui semble devoir échapper à certaines des objections formulées à l'encontre d'autres vaccins.

Au Canada, l'équipe des Connaught Laboratories de Toronto¹⁸ sous la direction de L. N. Farrell a entrepris la fabrication en grand d'un vaccin type Salk selon une technique simplifiée et en employant un milieu de culture synthétique dérivé du milieu 199 de Morgan, Morton & Parker⁴⁹ dont l'emploi s'est généralisé. A l'Institut Pasteur (Lépine⁴⁰), la méthode employée permet un calcul exact du rendement en virus par rapport au nombre de cellules servant de support à la culture et l'extraction du virus

est facilitée par la précipitation des protéines. En Afrique du Sud, Gear prépare de même un vaccin de culture inactivé, et peu à peu la plupart des instituts spécialisés dans l'étude des virus se transforment plus ou moins en producteurs de vaccins.

Vaccination par virus muté avirulent

La deuxième méthode, celle de l'obtention de souches avirulentes mais immunisantes, représente la tendance primitive de la majorité des expérimentateurs. Elle a à son actif, de chercher, par l'administration orale d'un virus actif mais non paralytogene, à reproduire le mécanisme de l'immunité spontanée telle qu'elle est déclenchée dans les conditions naturelles.

Le chapitre des vaccins à base de virus mutés, modifiés ou adaptés est ainsi largement ouvert et très loin d'être clos. Il y a beaucoup à en attendre, mais le fait même qu'il s'adresse par principe à des virus actifs en rend l'expérimentation plus longue et prolonge d'autant le stade probatoire avant les essais d'application à l'homme.

Enders, Weller & Robbins¹⁵ ont observé qu'un virus du type 1 (souche Brunhilde) entretenu en culture de tissus sur cellules humaines d'origine non nerveuse avait après passage en série perdu sa capacité de produire des paralysies alors même qu'il était inoculé au singe par voie intracérébrale. Arrivée à ce point de son évolution, cette souche n'est ni paralytogene ni immunogene pour le singe cynomolgus, mais ainsi que l'a vu Sabin⁵⁷ en 1953, elle est capable, administrée par voie orale au chimpanzé, d'immuniser cet animal contre des souches virulentes tout en étant incapable de le paralyser, même après inoculation intracérébrale. Néanmoins, après culture sur rein de singe, la souche peut occasionnellement redevenir pathogene, pour les singes inférieurs et par la voie intracérébrale. Cette possibilité de « retour en arrière » constitue à l'heure actuelle son plus sérieux obstacle à un emploi chez l'homme, qu'il s'agisse d'un véritable retour à la virulence, ou, ce qui paraît plus probable, d'une sélection des particules virulentes qui persistent dans une « population » de particules atténuées.

Sabin, Hennessen & Winsser⁵⁹ ont employé les passages rapides sur culture de tissus de singes cynomolgus pour obtenir des souches avirulentes des trois types du virus, et Sabin⁵⁸ voit dans les clones de virus dénuées par adaptation de pouvoir cytopathogene in vitro un moyen de sélectionner les souches qui pourraient devenir des candidats à une application pratique.

De leur côté, Li & Schaeffer⁴⁶ ont obtenu une variante de la souche Mahoney du type 1 sur souris qui, reportée sur le singe a perdu son pouvoir pathogene tout en conservant son pouvoir immunogene. Les mêmes auteurs, avec Nelson⁴⁷ ont obtenu la multiplication du virus poliomyélitique sur tissu rénal de singe greffé à la chorio-allantoïde d'œuf, avec modification du pouvoir pathogene.

Koprowski, Jervis & Norton³⁷ ont adapté une souche du type 2 au sigmodon nouveau-né et lui ont progressivement fait perdre son pouvoir

pathogène. Administrée par voie orale à un petit groupe d'enfants, elle a déterminé chez la majorité d'entre eux l'apparition d'anticorps spécifiques pour les souches du type 2, sans déterminer aucun accident. Ces mêmes auteurs, avec Nelson³⁸ poursuivent leurs essais dans des conditions qui semblent très encourageantes, et disposent maintenant de virus des types 1 et 2 utilisables par voie digestive.

Moyer, Accorti & Cox⁵⁰ ont adapté la souche MEF1 du type 2 au hamster et ont obtenu, comme Koprowski, la perte du pouvoir paralytogene de cette souche. Ils ont démontré chez l'animal, rhésus et chimpanzé, son aptitude à déterminer une immunité active sans risques apparents de poliomyélite. Mais, ici encore, il s'agit du type 2 seulement, le moins répandu chez l'homme, qui avait été choisi à cause de la facilité qui le caractérise, de s'adapter aux rongeurs.

Roca-Garcia, Moyer & Cox,⁵⁶ Cabasso et al.¹⁰ partant du 131^e passage sur hamster de la souche de Roca-Garcia ont réussi à adapter cette dernière à l'embryon de poulet et à obtenir régulièrement sa culture dans l'œuf de poule fécondé. Plus récemment, Cabasso a obtenu, de la même manière et par la même voie l'adaptation à l'œuf d'une souche du type 1, ce qui constitue un progrès considérable et ouvre la porte à de sérieux espoirs d'obtenir ainsi sur l'œuf de poule des souches immunisantes dépourvues de tout pouvoir paralytogene comme cela a déjà été obtenu pour le virus rabique (souche Flury), le virus amaril (souche 17 D) et nombre de virus pathogènes des animaux.

Au Maroc, Blanc & Martin³ ont expérimenté avec un virus obtenu par injection au lapin de matériel poliomyélitique virulent. Ils ont ainsi isolé un virus qui tue le lapin avec les symptômes d'une maladie fébrile et septicémique (grosse rate, pas de lésions du système nerveux, pas de paralysies) et qui se conserve indéfiniment sous forme inapparente chez la souris. Ce virus s'étant montré dénué de tout pouvoir pathogène chez le singe, il a été administré par la voie buccale à des volontaires humains avec la même innocuité. Considérant qu'il s'agit là d'un virus poliomyélitique muté, Blanc & Martin ont entrepris une campagne d'immunisation de l'homme par administration orale de virus vivant sous forme d'une émulsion de rate et de sang de lapin infecté avec ce virus. Les résultats connus confirment l'innocuité, qui paraît certaine, du virus. Il est plus difficile de se prononcer sur sa valeur immunisante. L'expérimentation poursuivie à l'Institut Pasteur avec le virus originel que MM. Blanc et Martin ont bien voulu nous adresser au mois de juin 1953 et qui a été poursuivie pendant plusieurs mois s'est montrée assez décevante. Le virus marocain ne produit pas, en culture in vitro, les lésions caractéristiques du virus poliomyélitique et il n'a été neutralisé, entre nos mains, par aucun des sérums spécifiques des trois types de poliomyélite. Administré au singe, il se montre inoffensif quelles que soient la dose et la voie d'introduction, mais n'a pas fait apparaître d'anticorps chez cet animal et n'a entraîné dans nos essais aucune résistance

à l'inoculation d'épreuve, les singes vaccinés succombant dans les mêmes délais que les singes témoins. Il nous paraît plutôt s'agir, avec ce virus dont les caractéristiques sont très différentes de celles du virus poliomyélitique (absence de pouvoir cytopathogène, non-résistance à la glycérine, diffusion par voie sanguine), d'un virus parasite des rongeurs plutôt que d'un véritable virus poliomyélitique muté.

Vaccination par virus actif neutralisé

La troisième méthode, c'est-à-dire l'emploi de virus actif adapté ou non, concurremment avec une immunisation passive, est dérivée de très nombreuses observations expérimentales depuis les premiers essais de Flexner & Lewis,¹⁹ les plus récentes étant celles de Rhodes & Clark,⁵⁵ de Bodian,^{5, 6} et de Hammon.²⁴ Un certain nombre d'essais comportent l'injection d'un mélange virulent neutralisé par le sérum. Sabin⁵⁷ juge cette pratique dans son principe inefficace s'il y a excès d'anticorps ou dangereuse s'il y a excès de virus, et dans tous les cas exposant au risque d'une dissociation du mélange neutralisé. D'autres essais comportent l'administration séparée mais concomitante d'anticorps, d'une part, en injection, et de virus actif, d'autre part, en ingestion. C'est de toutes les méthodes celle qui se rapproche le plus de l'immunisation spontanée obtenue chez 95 % des sujets dans les conditions naturelles. Mais il est évident que, si l'on emploie un virus actif non modifié, les risques encourus sont de l'ordre de grandeur de ceux qui ressortent des chances de contamination naturelle, et que, si l'on utilise un virus suffisamment adapté à l'animal pour être certainement non paralytogene pour l'homme, il est actuellement difficile d'apprécier le degré réel de protection assuré par la méthode.

Il faut signaler également que l'emploi simultané de la protection passive et de l'immunisation active peut avoir pour effet de retarder, par rapport aux témoins, le moment où s'installe l'immunité, ce qu'il faut prendre en considération lorsque la vaccination est pratiquée comme ce sera généralement le cas, en milieu infecté, c'est-à-dire sur une population soumise aux hasards de l'infection naturelle. En effet, d'après les constatations, encore en partie inédites, faites au cours de l'expérience d'application de la gamma-globuline aux Etats-Unis en 1953, on a eu l'idée de comparer les taux d'anticorps observés au bout de plusieurs mois chez les sujets qui avaient reçu la gamma-globuline et chez ceux qui, n'ayant pas reçu cette injection étaient considérés comme témoins vivant en milieu infecté. L'examen ayant eu lieu au bout de plusieurs mois, et la gamma-globuline injectée étant, on le sait, pratiquement éliminée au bout de huit semaines, les anticorps mesurés étaient bien les anticorps naturellement acquis par les uns ou les autres des sujets au cours de l'épidémie et du fait de la contamination spontanée à laquelle ils avaient été exposés.

Or, il s'est trouvé, dans l'ensemble, que les taux d'anticorps rencontrés chez les témoins ont été plus élevés que chez ceux qui avaient reçu la gamma-

globuline. Ces derniers avaient été en effet partiellement protégés contre l'infection et avaient moins réagi à la stimulation antigénique de l'infection naturelle. Dans ces conditions, il serait possible que la vaccination par un mélange d'anticorps et d'antigène ou par l'injection simultanée mais en des points différents de l'un et de l'autre, tout en se montrant efficace, mette un temps plus long à réaliser l'immunité que la vaccination par des méthodes employant l'injection d'antigène seul.

CONCLUSIONS

Quelles sont, au stade actuel des recherches, les perspectives d'une vaccination contre la poliomyélite?

Un premier point semble acquis: les méthodes les plus récentes de culture du virus poliomyélitique à partir de cultures de tissus sensibles non nerveux mettent à notre disposition des préparations vaccinales suffisamment riches en antigène et suffisamment purifiées pour pouvoir être applicables à la vaccination de l'homme. Ces dernières déterminent chez l'homme l'apparition d'anticorps dans des délais et à un taux correspondant à ceux qui, chez l'animal assurent une protection certaine contre les conséquences paralytiques d'une infection poliomyélitique.

On peut donc espérer que de tels vaccins assureront chez l'enfant et chez l'homme un taux de protection statistiquement significatif contre la paralysie poliomyélitique. De tels vaccins peuvent être immédiatement préparés et seront vraisemblablement avant peu mis à la disposition du corps médical dans les différentes parties du monde.

Il se peut, mais il n'est pas certain, que ces vaccins apportent une solution définitive du problème. De même que nous ignorons encore le taux réel de protection qui sera assuré chez l'homme, nous ne savons pas, faute d'un recul suffisant, quelle est la durée de persistance des anticorps sériques, seule mesure à notre disposition du taux de l'immunité. Il se peut, et s'agissant de vaccins tués, il semble même probable que des revaccinations ou des injections de rappel seront nécessaires. Dans ces conditions, on peut se demander si une vaccination primaire par vaccin inactivé secondée par une revaccination ultérieure au moyen de souches actives des trois types de virus poliomyélitique suffisamment atténuées pour que leur pouvoir paralytogene soit considéré comme pratiquement supprimé, ne fournirait pas la meilleure solution en assurant un effet de rappel immunitaire par la réponse de l'organisme à un virus actif. Cette perspective nous paraît particulièrement engageante, mais il faut reconnaître qu'à l'heure actuelle nous n'avons pas encore une expérience assez prolongée des souches atténuées du virus poliomyélitique et une garantie suffisante de stabilité pour procéder à de larges applications.

Considérée sous l'angle pratique, la vaccination contre la poliomyélite nous apparaît comme une mesure devant intervenir de préférence au cours

de la première année de la vie chez l'homme, après le sixième mois, moment où l'enfant a perdu les anticorps maternels d'origine placentaire, et avant le 12^e mois, puisque c'est encore aujourd'hui le groupe d'âge de un à trois ans qui comporte la plus grande incidence paralytique de la poliomyélite. Cette primo-vaccination devrait être faite avec un virus tué, de manière à provoquer sans danger l'immunité de base nécessaire pour faire apparaître dans le sérum de l'enfant les premiers anticorps contre les trois types du virus. Cette immunité de base obtenue faut-il laisser faire la nature? Faut-il la renforcer par des injections de rappel ou la compléter par l'immunisation au moyen d'un virus vivant atténué? L'avenir le dira. Au reste, la réponse pourra varier suivant les différentes régions du monde. On peut concevoir que dans les pays où les conditions d'hygiène demeurent primitives et où les infections naturelles sont fréquentes, les chances de réinfections par un virus naturel soient suffisantes pour entretenir l'immunité de base obtenue par la primo-vaccination. Mais il nous semble préférable de ne pas se fier au hasard et de veiller au maintien de l'immunité obtenue. Dans les pays où le développement de l'hygiène rend moins probables les réinfections naturelles, un effet de rappel devra de toute façon être obtenu, soit par réinjection de virus tué, soit par administration de virus vivant atténué.

Somme toute, la situation en présence de l'infection poliomyélitique nous paraît se rapprocher très étroitement de la question de l'immunisation antidiphthérique. De même que la vaccination par l'anatoxine empêche les conséquences paralytiques de l'intoxication diphthérique mais ne suffit pas toujours à empêcher l'état de porteur de germes, de même, il ne semble pas que la vaccination seule suffise à diminuer les risques d'infection par le virus poliomyélitique si le développement de l'hygiène n'y contribue pas pour sa part. De même que, dans les pays où par suite des progrès de l'hygiène l'infection diphthérique est devenue rare, l'immunité engendrée par la vaccination doit être entretenue par des injections de rappel, de même dans les régions où l'hygiène est développée et où les chances d'infection spontanée par le virus de la poliomyélite sont réduites, l'immunité antipoliomyélitique obtenue par la vaccination devra être entretenue ou renforcée par les injections de rappel.

Il se peut que lorsqu'on commencera à vacciner contre la poliomyélite sur une grande échelle on fasse bénéficier tout d'abord les sujets dépourvus d'anticorps contre l'un ou l'autre ou les trois types du virus poliomyélitique, c'est-à-dire les sujets ne présentant pas d'évidence d'un contact antérieur avec le virus et chez qui l'établissement d'une immunité de base présente de ce fait un intérêt primordial. Mais il est évident qu'au fur et à mesure que des quantités plus grandes de vaccin deviendront disponibles, il y aura avantage, pour assurer la protection d'une population entière, à vacciner de façon indiscriminée les sujets n'ayant pas d'anticorps et ceux qui en possèdent déjà. Nous savons en effet, d'après les documents de Salk,⁶² que la vaccination de sujets ayant déjà un certain niveau d'anticorps aboutit

à une ascension rapide et à un relèvement à un niveau très élevé des anticorps préexistants, et ce résultat est acquis semble-t-il sans aucune réaction apparente de l'organisme.

Le moment est donc venu où l'on peut penser que la vaccination anti-poliomyélitique entrera bientôt dans la pratique, et qu'elle exercera sur l'incidence de la maladie paralytique une influence comparable à celle que la vaccination par l'anatoxine diphtérique a exercé sur l'épidémiologie de cette affection. Cet espoir, qui pouvait paraître utopique il y a deux ans, est, tout au moins sur le plan expérimental, aujourd'hui justifié.

SUMMARY

In a review of the various methods of individual and mass protection against poliomyelitis, the author notes that chemoprophylaxis has not yet given positive results.

Passive immunization by injection of gamma globulin—produced by fractionating human serum—has been experimented with on a large scale in the USA. This method has serious limitations, however. Gamma globulin is scarce and expensive, and gives only short-term protection which does not begin until a week after injection. The protection conferred is therefore uncertain since it is in the week following the appearance of the first case that 90% of secondary cases develop. The results of recent experiments in the USA have not been very encouraging.

At the present time the greatest hope of halting the scourge of poliomyelitis is founded on active immunization by vaccination. Theoretically, the aim is to reproduce in children, particularly in regions where standards of hygiene are high, what naturally and spontaneously occurs in children in less developed areas, that is, the development of immunity to the three types of virus—and that without the few cases of paralytic poliomyelitis which develop among spontaneously infected children. In practice the problem is very complicated. It has not so far been possible to cultivate the virus on the usual bacteriological media or—with the exception of one strain—on incubated chicken's eggs. It develops only on a culture of human or monkey tissue (renal cells of monkeys, fibroblasts of human tonsils, or human embryonic or tumour cells). The virus is a mediocre antigen; great quantities of virus must be used and there is a risk that immunity may be only short-lived. There are fluctuations in response which are determined by physiological, endocrinous, climatic, and seasonal factors. The three types of virus do not confer cross-immunity. Finally, since poliomyelitis is still a relatively rare disease, and as the chances of contracting it are relatively small, the risks inherent in vaccination must be at least less than the risks of contracting paralytic poliomyelitis. Furthermore, in order to be able to observe any significant difference between vaccinated subjects and control subjects, several hundred thousand persons must be vaccinated for proper evaluation of a vaccine.

In theory, the following may be used for vaccination: strains of virulent, killed virus (the vaccine being administered by injection); attenuated strains (apathogenic live virus administered orally or by injection); or neutralized strains (active virus injected under cover of passive protection provided by specific antibodies).

The use of nerve tissue for the culture of the virus to be used for injection should be avoided on account of the risks inherent in the introduction into the human organism of heterologous nerve tissue. For similar reasons tumour cells should not be used. However, the problem has been solved by the recent discovery of the possibility of culturing virus on normal human tissue other than nerve tissue.

The main objection to killed vaccine is that it confers shorter-term immunity than the live variety; periodic revaccination may therefore be necessary. However, the method

with which the greatest practical advances have been made (Salk vaccine) is vaccination with killed virus.

There are two arguments in favour on the attenuated live strains : first, the most effective vaccination against certain virus diseases, such as rabies and yellow fever, has been done with attenuated live virus, and, secondly, this method reproduces the natural immunization process. There is, however, no proof as yet that the mutations obtained attenuating the virulence of the virus cannot be reversed. Neither has simultaneous mutation or the same degree of attenuation been obtained with the three types of virus.

The author wonders whether the best solution would be to give primary vaccination with killed virulent vaccine (giving basic immunity), followed later by revaccination with the three types of virus attenuated to a point where their paralytogenic power is practically eliminated. However, experience with attenuated strains, and, particularly knowledge of their stability, is not yet great enough for this to be done on a large scale.

The problem of immunization against poliomyelitis recalls that of diphtheria immunization. Just as toxoid vaccination prevents the paralytic consequences of diphtheria but does not necessarily eliminate carriers, so with poliomyelitis it would seem that vaccination alone is not sufficient to remove the risk of infection. The immunity to poliomyelitis conferred by vaccination will probably have to be maintained and reinforced by repeat injections.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Barski, G., Lépine, P., Monaci, V. & De Brion, G. (1953) *Ann. Inst. Pasteur*, **84**, 825
2. Bingel, K. F. & Engelhardt, H. (1954) *Medizinische*, N° 23, 823
3. Blanc, G. & Martin, L. A. (1953) *Bull. Acad. Méd. (Paris)*, **137**, 230
4. Bodian, D. (1949) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **72**, 259
5. Bodian, D. (1951) *Amer. J. Hyg.* **54**, 132
6. Bodian, D. (1952) *Amer. J. Hyg.* **56**, 78
7. Boyd, T. E. (1953) *Bact. Rev.* **17**, December Suppl.
8. Brown, G. C. (1952) *J. Immunol.* **69**, 441
9. Brown, G. C. & Ackermann, W. W. (1951) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **77**, 367
10. Cabasso, V. J., Stebbins, M. R., Dutcher, R. M., Moyer, A. W. & Cox, H. R. (1952) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **81**, 525
11. Cochran, K. W. et al. (1954) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **85**, 104
12. Cox, H. (1953) *Bull. N. Y. Acad. Med.* **29**, 943
13. Davide, H. (1928) *Bull. Off. int. Hyg. publ.* **20**, 74
14. Dulbecco, R. & Vogt, M. (1954) *J. exp. Med.* **99**, 167
15. Enders, J. F., Weller, T. H. & Robbins, F. C. (1952) *Fed. Proc.* **11**, 467
16. Faber, H. K. & Dong, L. (1953) *Amer. J. Dis. Child.* **86**, 469
17. Faber, H. K. & Dong, L. (1953) *Pediatrics*, **12**, 657
18. Farrell, L. N., Wood, W., Franklin, A. E., Shimada, F. T., Macmorine, H. J. & Rhodes, A. J. (1953) *Canad. J. publ. Hlth*, **44**, 273
19. Flexner, S. & Lewis, P. A. (1910) *J. Amer. med. Ass.* **54**, 1780
20. Francis, T., jr, Brown, G. C. & Kandel, A. (1954) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **85**, 83
21. Gershoff, S. N., Rasmussen, A. F., jr, Elvehjem, C. A. & Clark, P. F. (1952) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **81**, 484
22. Hammon, W. McD. (1950) *Pediatrics*, **6**, 696
23. Hammon, W. McD. (1953) *Amer. J. med. Sci.* **226**, 125
24. Hammon, W. McD., Cheever, F. S. & Sather, G. E. (1952) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **80**, 150

25. Hammon, W. McD., Coriell, L. L. & Stokes, J., jr (1952) *J. Amer. med. Ass.* **150**, 739
26. Hammon, W. McD., Coriell, L. L. & Stokes, J. jr (1952) *J. Amer. med. Ass.* **150**, 750
27. Hammon, W. McD., Coriell, L. L., Wehrle, P. F., Klimt, C. R. & Stokes, J. jr (1952) *J. Amer. med. Ass.* **150**, 757
28. Hammon, W. McD., Coriell, L. L., Wehrle, P. F. & Stokes, J., jr (1953) *J. Amer. med. Ass.* **151**, 1272
29. Hammon, W. McD., et al. (1954) *J. Amer. med. Ass.* **156**, 21
30. Harmon, P. H. (1937) *J. Amer. med. Ass.* **109**, 1061
31. Hemmes, G. D. (1953) *Communication à la douzième session du Comité de Santé publique de l'Organisation du Traité de Bruxelles*, Bcrdeaux
32. Hornus, G., *La périodicité saisonnière des maladies épidémiques et en particulier de la poliomyélite* (Thèse, Paris)
33. Jungeblut, C. W. (1951) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **77**, 176
34. Klarenbeek, A. (1951) *Antonie v. Leeuwenhoek*, **17**, 237
35. Klarenbeek, A. & Tongeren, H. A. van (1954) *Ned. T. Geneesk.* **98**, 768
36. Kotaoka, M., Miura, T. & Hori, K. (1953) *Jap. J. med. Sci. Biol.* **6**, 475
37. Koprowski, H., Jervis, G. A. & Norton, T. W. (1952) *Amer. J. Hyg.* **55**, 108
38. Koprowski, H., Jervis, G. A., Norton, T. W. & Nelson, D. J. (1953) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **82**, 277
39. Lépine, P. (1935) *Rev. Immunol.* **1**, 480
40. Lépine, P. (1954) *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **239**, 1555
41. Lépine, P., Barski, G., Endo, M. & Blusson, J. (1954) *C. R. Acad. Med. (Paris)*, **138**, 50
42. Lépine, P. & Levaditi, J. C. (1943) *Bull. Acad. Med. (Paris)*, **127**, 526
43. Lépine, P., Nantel, A. & Reinié, L. (1950) *Action sur le virus poliomyélitique (souche Lansing) du venin de Vipera russellii*. Cité dans *Cinquième Congrès international de Microbiologie, Rio de Janeiro, 17-24 de Août de 1950, Résumé des travaux*, Rio de Janeiro, p. 100
44. Lépine, P. & Pavilanis V. (1952) *Ann. Inst. Pasteur*, **82**, 145
45. Levaditi, C. (1913) *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **75**, 202
46. Li, C. P. & Schaeffer, M. (1953) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **82**, 477
47. Li, C. P. Schaeffer, M. & Nelson, D. B. (1954) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **87**, 153
48. Makarova, K. M. & Rumianserra-Russtikh, M. V. (1954) *Ž. Nevropat. i Psikhiat.* **54**, 189
49. Morgan, J. F., Morton, H. J. & Parker, R. C. (1950) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **73**, 1
50. Moyer, A. W., Accorti, C. & Cox, H. (1952) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **81**, 513
51. Netter, A. & Levaditi, C. (1910) *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **68**, 617
52. Niggemeyer, H. (1953) *Arch. Kinderheilk.* **147**, 170
53. Pait, C. F., Kokko, U. P. & Kessel, J. F. (1953) *Amer. J. Hyg.* **58**, 65
54. Rasmussen, A. F. jr, Weaver, R. W., Elvehjem, C. A. & Clark, P. F. (1953) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **84**, 306
55. Rhodes, A. J. & Clark, E. M. (1951) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **76**, 379
56. Roca-Garcia, M., Moyer, A. W. & Cox, H. R. (1952) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **81**, 519
57. Sabin, A. B. (1953) *Amer. J. Dis. Child.* **86**, 301
58. Sabin, A. B. (1954), *Science*, **120**, 357
59. Sabin, A. B., Hennessen, W. A. & Winsser, J. (1954) *J. exp. Med.* **99**, 551
60. Sabin, A. B. & Olitsky, P. K. (1936) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **34**, 357
61. Salk, J. E. (1953) *J. Amer. med. Ass.* **151**, 1081
62. Salk, J. E., Bazeley, P. L., Bennett, B. L., Krech, U., Lewis, L. J., Ward, E. N. & Youngner, J. S. (1954) *Amer. J. publ. Hlth*, **44**, 994

63. Salk, J. E., Krech, U., Youngner, J. S., Bennett, B. L., Lewis, L. J. & Bazeley, P. L. (1954) *Amer. J. Publ. Hlth*, **44**, 563
64. Salk, J. E., Lewis, L. J., Bennett, B. L. & Youngner, J. S. (1952) *Fed. Proc.* **11**, 480
65. Sander, M., Akin, B. A. & Soret, M. G. (1954) *Acta neuroveg. (Wien)*, **8**, 362
66. Schnitzer, R. J., Buck, M. & Steiger, N. (1951) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **77**, 182
67. Schultz, E. W. & Gebhardt, L. P. (1933) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **30**, 1010
68. Schultz, E. W. & Gebhardt, L. P. (1933) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **31**, 728
69. Shope, R. E. (1953) *J. exp. Med.* **97**, 601
70. Syverton, J. T., Scherer, W. F. & Butorac, G. (1951) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **77**, 23
71. Toomey, J. A. (1935) *Science*, **82**, 200
72. Ueda et al. (1953) *Pharm. Bull.* **1**, 379
73. United States National Foundation for Infantile Paralysis, Committee on Typing, et al. (1952) *Immunologic classification of poliomyelitis viruses*. In: *Poliomyelitis, papers and discussions presented at the Second International Poliomyelitis Conference, Copenhagen, 1951*, Philadelphia, p. 419
74. United States Public Health Services, Bureau of State Services (1954) *Publ. Hlth Rep. (Wash.)*, **69**, 519
75. United States Public Health Service, National Advisory Committee for the Evaluation of Gamma Globulin (1954) *J. Amer. med. Ass.* **154**, 1086
76. Youngner, J. S., Ward, E. N. & Salk, J. E. (1952) *Amer. J. Hyg.* **55**, 291, 301